فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۳ ص. ۳۱-۱۹

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات عصاره متانولی زعفران بر انسفالومیلیت خود ایمن تجربی در موش‌های C57BL/6

شمیلا اسلامبولچی[۱*]، محمد حسین صنعتی[۲]، کمال‌الدین حق بین[۳]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

[۲] آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

[۳] آزمایشگاه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): seslambolchy@yahoo.com

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۱

چکیده

انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) یک بیماری التهابی میلین‌زُدای دستگاه عصبی مرکزی است و معمولا به عنوان یک مدل جانوری برای بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) استفاده می‌شود. التهاب یک پدیده مهم در EAE و MS است که به از بین رفتن میلین و در پی آن وقوع ناتوانی حسی و حرکتی منجر می‌شود. چنین نشان داده شده است که عصاره‌های کلاله گیاه زعفران (*Crocus sativus L.*) در موشهای رت فعالیت ضد التهابی دارند. از سویی شواهد داروشناختی جدیدی درباره اثرات ضد توموری، محافظت ژنی، محافظت دربرابر عوامل شیمیایی و همچنین توانایی رادیکال خواری برای عصاره‌های زعفران یا اجزای آن ارائه شده است. ما در این پژوهش مشاهده کردیم که استفاده از دگزامتازون یا عصاره‌های متانولی کلاله زعفران در دوزهای ۱۰۰mg/kg یا بیشتر در موش‌های ماده C57BL/6 تلقیح شده با pMOG به طور معنی‌داری از پیشرفت EAE جلوگیری نمودند. عصاره خیسانده آبی زعفران مانع پیشرفت EAE نگردید. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که زعفران ممکن است با برخورداری از فعالیت ضد التهابی نشانه‌های EAE را از بین ببرد.

کلیدواژه‌ها: انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، زعفران، میلین اولیگودندروسیت گلیکوپروتئین.

مقدمه

انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) یک بیماری التهابی دستگاه عصبی مرکزی است که به واسطه فعالیت سلول‌های Tبه وجود می‌آید و در جوندگان و سایر گونه‌های جانوری با تزریق میلین، پروتئین‌های میلین و پپتیدهای خاصی از پروتئین‌های میلین به عنوان آنتی‌ژن‌هایی که می‌توانند واکنش ایمنی ایجاد کنند، القاء می‌شود [۳،۱،۲]. از میان این آنتی‌ژن‌های بالقوه، گلیکوپروتئین اولیگودندروسیتی میلین (MOG) برای القای EAE در موش‌های C57BL/6 بهترین انتخاب است [۴، ۵، ۶]. التهابی که توسط القای EAE در دستگاه عصبی مرکزی رخ می‌دهد به فلج و دیگر ناهنجاری‌های عصبی منجر می‌شود که از بسیاری جهات مشابه بیماری اسکلروز چندگانه (مالتیپل

اسکلروزیس) در انسان است. مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خود ایمن ناتوان کننده عصبی است که چنین تصور می‌شد که اغلب ماده سفید را در دستگاه عصبی مرکزی (CNS) مورد هدف قرار می‌دهد اما امروزه با استفاده از روش تصویر برداری رزونانسی مغناطیسی (MRI) مشخص شده است که با پیشرفت بیماری MS آتروفی پارانشیم مغزی و ماده خاکستری (GM) هم به ویژه در هر دو نوع عود کننده - بهبود یابنده و پیشرونده ثانویه اتفاق می‌افتد [۷]. آتروفی پیشرونده GM به شدت با بروز ناتوانی بالینی در بیماری MS در ارتباط است و شاخص مهمی در پیشرفت بیماری است. بروز التهاب، از بین رفتن میلین و تخریب نورونی سه شاخص بیماری مالتیپل اسکلروزیس هستند که به طور کامل به هم پیوسته هستند. بهترین مدل جانوری برای درک چگونگی پیشرفت این وقایع مدل تجربی EAE مزمن ایجاد شده با استفاده از پپتید MOG_{35-55} در موش‌های C57Bl/6 است [۷] که اصولا مستعد ابتلا به بیماری‌های خود ایمن هستند [۸]. علت بروز بیماری MS هنوز به طور کامل روشن نشده است اما، معلوم شده است که وقوع التهاب و پاسخ‌های ایمونولوژیک در آغاز و پیشرفت بیماری نقش دارند [۹،۱۰،۱۲،۱۱] اما مشخص نشده است که التهاب چگ.نه باعث تخریب بافت عصبی می‌شود [۷]. در آزمایشاتی، پاسخ التهابی که منجر به ازبین رفتن میلین و مرگ اولیگودندروسیتی می‌شود با دخالت بازخوردهای مثبت و منفی بر علیه آنتی‌ژن‌های خودی بدن فعال شدند و سبب بروز علایم بالینی بیماری شدند [۱۰،۱۲]. شواهد آزمایشگاهی اخیر نشان داده‌اند که کلاله گیاه زعفران با نام علمی *Crocus sativus L.* فعالیت حاد و مزمن ضد التهابی دارد [۱۳].

زعفران از مولکول‌های شناخته شده‌ای همچون آب، روغن‌های فرّار، مواد نیتروژن‌دار، فیبر، قندها تشکیل شده است. زعفران همچنین محتوی دو ویتامین مهم شامل ریبوفلاوین و تیامین، انواعی از استرول‌های گیاهی و انواعی از اسیدهای چرب است. مهمترین جزءفرار زعفران سافرانال است که مسئول اصلی عطر زعفران است. کروسین جزء دیگری است که مسئول ایجاد رنگ زعفران است و متابولیت آن کروستین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی دارد [۱۴].

زعفران در طب سنتی به عنوان یک داروی ضد اسپاسم، بهبود دهنده هضم و ضد نفخ، ضد نزله، خلط آور، انگیزاننده، تعریق‌زا، مقوی قوای جنسی، قاعدگی‌آور، تسکین دهنده لثه و تسکین دهنده اعصاب به کار می‌رود [۱۵]. مطالعات داروشناختی اخیر نشان داده‌اند که عصاره زعفران یا اجزای فعال آن اثرات ضد تشنج و ضد افسردگی [۱۶، ۱۷، ۱۴]، ضد توموری [۱۸، ۱۲]، بهبود دهنده یادگیری و حافظه و ویژگی‌های رادیکال خواری [۲۱،۱۵،۲۰،۱۹] دارد. عصاره زعفران باعث القای استرس اکسیداتیو در موش می‌شود [۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵]. به علاوه، اجزای زعفران در شرایط آزمایشگاهی با مهار سایتوکین پیش التهابیِ TNF-alpha مانع مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌شود [۱] و از رت‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو القا شده توسط ایسکمی محافظت می‌کند [۱۴،۲۶].

میلین‌زدایی در بیماری‌های نورودژنراتیو و از جمله در بیماری مالتیپل اسکلروزیس با از دست رفتن حمایت تروفیک، آکسون‌های مستعد تخریب عصبی (نورودژنراسیون) را درگیر می‌کند و بازسازی میلین یک فرایند محافظ عصبی است که احتمال دارد عملکردهای از دست رفته را بازگرداند. در حالی که ترکیبات بالقوه میلین‌ساز متعددی در پژوهش‌های آزمایشگاهی شناسایی شده‌اند اما همه آنها موفقیت محدودی در آزمایش‌های بالینی انجام شده بر روی بیماران مبتلا به MS نشان داده‌اند. در بیماری MS التهاب مزمن و آسیب آکسونی با میلین‌سازی تداخل می‌کنند. هم نقص داخلی دودمان سلولی اولیگودندروسیتی و هم ممانعت‌های حاصل از روند ریز آسیب‌های محیطی که به بخش‌های مختلف عصبی وارد می‌شود تمایز سلول‌های پیشساز اولیگودندروسیتی - که برای بازسازی میلین و درمان ضروری است- و تولید غلاف‌های میلین جدید را به شیوه‌ای منفی تحت تاثیر قرار می‌دهند [۹]. لاجرم در درجه نخست استفاده از مدل‌های جانوری برای درک چگونگی پیشرفت روند بیماری و سازوکارهای پیچیده آن و همچنین برای پیشرفت موفقیت آمیز درمان‌هایی که منجر به میلین‌سازی در MS می‌شوند ضروری است. در این راستا مدل جانوری EAE به وفور برای پژوهش در زمینه یافتن درمان‌های بالقوه برای بیماری MS مورد استفاده قرار گرفته است. ضرورت دیگر یافتن مواد و داروهایی است که علاوه

بر اثر بخشی در شرایط آزمایشگاهی و پیش بالینی، در شرایط بالینی بر روی نمونه انسانی هم اثر بخش باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی اثرات ضد التهابی عصاره‌های آبی و الکلی کلاله زعفران (*crocus sativus L.*) در موش‌های مبتلا شده به EAE به عنوان مدلی جانوری برای اسکلروز چندگانه (MS) بوده است.

مواد و روش‌ها

جانوران

در این پژوهش از موشهای C57BL/6 ماده ۶ تا۸ هفته‌ای با وزن بین ۱۴-۱۸ گرم استفاده شد که از بخش حیوانخانه انیستیتو پاستور کرج خریداری شده بودند. حیوانات در اتاقی اختصاصی و به دور از سایر جانوران در شرایط استاندارد آزمایشگاهی: دمای ثابت (۲۲C°±۲)، رطوبت (۳۰٪)، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا در حیوانخانه پژوهشگاه ملی مهندسی زنتیک و بیوتکنولوزی (NIGEB) نگهداری شدند.

مواد شیمیایی

گلیکوپروتئین اولیگودندروسیتی میلین (MOG) رتی شامل اسید آمینه‌های ۳۵-۵۵ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)، ادجاونت کامل فروند (CFA) و سم سیاه سرفه (لیوفلیزه) از سیگما خریداری شدند. متانول (اکسترا پیور)، اِن- هگزان سدیم کلراید، پتاسیم کلراید، Na_2HPO_4 و KH_2PO_4 از مِرک (Merck) خریداری شدند.

القای انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) با استفاده از پپتید MOG

برای القای انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، سیستم ایمنی جانوران به روش زیر تحریک شد:

۳۰۰ میکرولیتر از امولسیون ۱:۱ محتوی ۲۵۰ میکروگرم از $pMOG_{35-55}$ حل شده در سالین بافری فسفات (PBS) و ادجاونت کامل فروند (CFA) که با ۴ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Ra غیر فعال شده با حرارت کامل شده بود به یکی از پهلوهای جانور به شیوه زیر جلدی تزریق شد. یک دز معادل یک هفته بعد در پهلوی مقابل تزریق شد. در همان روز ایمنی‌زایی و ۴۸ ساعت بعد از آن به هر موش ۴۰۰ نانو گرم سم سیاه سرفه به شیوه داخل صفاقی تزریق شد [۲۴].

ارزیابی نورولوژیک EAE

موش‌ها روزانه از نظر علایمEAEمورد مشاهده قرار گرفتند و از ۶-۰ با، فواصل ۰/۵ تایی برای درجه‌بندی آسیب‌های بینابینی، نمره‌گذاری (رتبه‌بندی) شدند. علایم نورولوژیک به قرار زیر رتبه‌بندی شدند:

۰= هیچ علامت بالینی ندارد، ۱= قوام (تونیسته) دم از دست رفته است، ۲= فلج نسبی اندام عقبی، ۳= فلج کامل اندام عقبی، ۴= فلج اندام جلویی، ۵= فلج چهار اندام (پاراپلژی)، ۶= روبه مرگ یا مرده.

مشاهده برای ۶۰ روز پیاپی انجام شد و وزن موش‌ها به طور تصادفی اندازه گیری شد. غذا در دسترس موش‌های بی‌تحرک قرار گرفت. به حیواناتی که به دلیل فلجی نمی‌توانستند غذای عادی موش‌ها را بخورند روزی ۲ بار محلول ساکارز و آب به روش گاواژ از راه دهان خورانده می‌شد.

چندین پارامتر برای ارزیابی پیشرفت EAE و اثر تجویز عصاره زعفران مورد بررسی قرار گرفتند:

میانگین نمره بالینی یا MCS (mean clinical score) به عنوان جمع نمره‌های بالینی برای همه موشهای یک گروه در طی چندین روز معین تقسیم بر تعداد موش‌های آن گروه محاسبه شد. موشی که نمره۶گرفته بود در روز بعد از مرگ، در محاسبه نمره بالینی متوسط (MCS) به حساب نیامد.

با تعیین بیشینه نمره بالینی برای همه موش‌های یک گروه در طی دوره آزمایش و تقسیم آن بر تعداد کل موش‌های آن گروه متوسط میانگین بیشینه شدت یا MMS (mean maximum severity) محاسبه شد.

اندکس بیماری یا DI(disease index) با اضافه کردن متوسط نمره‌های بیماری برای هر موش در یک گروه در طی یک بازه زمانی معین تقسیم بر تعداد کل موش‌های آن گروه به دست آمد.

تیمار

حیوانات به ۱۴ گروه تقسیم شدند. و هر گروه شامل ۱۰ بود. یک کروه به عنوان کنترل (گروه sham) در نظر گرفته شد. به این معنی که ایمنی‌زایی در اعضای آن ایجاد شد ولی هیچ عصاره زعفرانی دریافت نکردند. گروه‌های ۵-۱ عصاره متانولی کلاله زعفران یا MCSE (methanol extract of crocus sativus stigma) را در دُزهای (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و۱۰۰۰میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند [۱۰]. گروه‌های ۱۰-۶عصاره آبی زعفران یا ACSE (aqueos extractof crocus sativus) را در دُزهای (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) به شیوه داخل صفاقی دریافت نمودند [۱۰]. تجویز عصاره‌ها زمانی آغاز شدند که نمره بیماری دست کم۳ بود. تیمار برای ۱۵روز پیاپی ادامه یافت. به اعضای یک گروه به ازای هر موش ۱۰۰میکرولیتر محلول PBS داخل صفاقی تجویز شد (کنترل منفی). به دو گروه باقیمانده دگزامتازون داخل صفاقی با دزهای (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) تزریق شد [۱۰]. این دو گروه آخر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

روش استخراج عصاره‌ها

برای عصاره‌گیری از کلاله‌های خشک زعفران (Crocus salivus L.) قرمز خالص ایرانی کشت داده شده در مزرعه محلی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، اهدایی دکتر کمال‌الدین حق بین، استفاده شد.

تهیه عصاره متانولی زعفران به شیوه زیر انجام شد:

۵ گرم از کلاله خشک زعفران در دمای اتاق و در تاریکی سه نوبت در اِن-هگزان برروی دستگاه همزن، همزده شد تا چربی‌زدایی شود. سپس سه مرتبه با متانول اکسترا پیور (٪۷۰) شستشو داده شد. عصاره‌های متانولی حاصل به هم اضافه شدند و با استفاده از صافی ۰/۴۵ میکرومتری (Schleicher & Schuell disposable filter holders) صاف شدند. مایع بالایی با استفاده از اسپکتروفوتومتر نورمرئی/ فرا بنفش (UV/Visible spectrophotometer) در بازه طیفی ۲۰۰ تا ۷۰۰نانومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (مدل دستگاه مورد استفاده: Cecil spectrophotometer, CE 9500, 9000 series بود). بلافاصله پس از طیف سنجی، به منظور حذف متانول، با استفاده از روش تبخیر چرخشی عصاره تحت شرایط خلاء، در تاریکی و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. (مدل دستگاه مورد استفاده: BUCHI Rotavapor R-200/205, BUCHI vacuum system V-500 and BUCHI vacuum controller V-800/805 بوده است). رسوب خیس حاصل در آب مقطر دیونیزه حل و سپس لیوفلیزه شد.

جهت تهیه عصاره آبی زعفران به شیوه زیر عمل شد:

۵ گرم از کلاله خشک زعفران در هاون چینی ساییده شد و دوبار، هربار به مدت ۳ ساعت در ۲۵ میلی‌لیتر اِن- هگزان خیسانده شد. مایع رویی دور ریخته شد و باقیمانده در دمای اتاق و در تاریکی به مدت یک ساعت در آب مقطر با استفاده از همزن برقی هم زده شد. پس از استخراج عصاره، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس از صافی واتمن (Whatman filter GF/F 0.7 µm) عبور داده شدند تا بقایای گیاهی از عصاره جدا شود. مایع حاصل با استفاده از دستگاه Cecil در بازه طیفی ۲۰۰-۷۰۰nm مورد طیف‌سنجی (اسپکتروفوتومتری) قرار گرفت. بلافاصله بعد از طیف سنجی عصاره‌های محلول در آب با هم یکی شدند و تحت شرایط خلاء تغلیظ و در شرایط انجماد خشک شدند.

در هردو روش عصاره گیری، پودرهای لیوفلیزه به اندازه‌های کوچک تقسیم شده و در میکروتیوب‌های جداگانه تا زمان مصرف در دمای ۲۰- ℃ نگهداری شدند. بازده وزنی (w/w) عصاره‌های آبی و متانولی کلاله‌های زعفران به ترتیب ۵۳٪/۳ و ۵۹٪/۷ بود.

تهیه محلول‌های تزریقی

برای تهیه محلول‌های تزریقی پودرهای خشک در دمای اتاق قرار داده شدند. با ترازوی حساس وزن کشی شدند و در بافر نمکی فسفات (PBS) به عنوان بستر حامل حل شدند و به طور جداگانه بر اساس غلظت خود در ظروف در بسته اتوکلاو شده تا زمان تزریق نگهداری شدند. محلول‌های تزریقی به صورت تازه و روزانه تهیه می‌شدند. حداکثر حجم تزریقی در هربار ۰/۱ml بود.

تجزیه و تحلیل آماری

اختلاف‌های آماری معنی دار درمورد MCS، DI و MMS با روش ANOVA یک طرفه با ($p \leq 0.001$) و آزمون‌های تعقیبی (post hoc comparisons) با استفاده از Scheffe's F test با ($p \leq 0.05$) تعیین شدند. داده‌های حاصل از میانگین نمره بالینی روزانه ±خطای استاندارد (daily MCS ± SE) برای رسم منحنی‌ها به کار رفتند.

نتایج

انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) در موش‌های ماده C57BL/6 با استفاده از $pMOG_{35-55}$ القا شد. حیوانات به طور تصادفی وزن شدند و روزانه از نظر بروز علایم بیماری مشاهده شدند و بر اساس دستور گفته شد در بخش روش‌ها نمره‌دهی شدند. تیمار دارویی هنگامی اغاز شد که هر موش (در هر گروه) در مرحله شدید بیماری قرار داشت یعنی دست کم نمره بیماری او به مدت یک روز ۳ یا بیشتر بود. آنچنان که در نمودار ۱ نشان داده شده است ۱۰۰mg/kg و ۵۰۰mg/kg و ۱۰۰۰mg/kg از عصاره متانولی کلاله زعفران (MCSE) به‌طور معنی‌داری MCS را در مقایسه با دزهای کمتر و گروه‌های تیمار شده با PBS و گروه sham کاهش داده است ($P \leq 0.001$) .

نمودارهای ۲ و ۳ نشان می‌دهند که اندکس بیماری (DI) و میانگین بیشینه شدت (MMS) در EAE با همان دزهای کاهش دهنده MCS از عصاره متانولی زعفران کاهش می‌یابند اما دزهای ۱۰۰mg/kg و ۵۰۰mg/kg در کاهش DI از دز ۱۰۰۰mg/kg موثرترند.

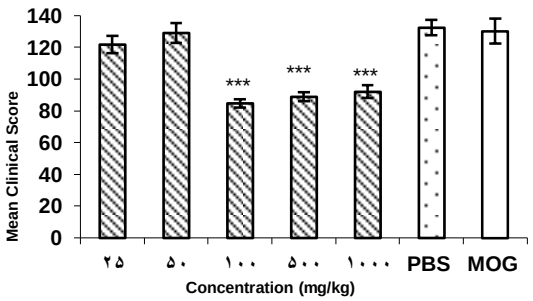
به عنوان کنترل مثبت برای عصاره زعفران از دگزامتازون استفاده شد. نمودار ۴ نشان می‌دهد که اثرات ۰/۵mg/kg و ۱mg/kg از دگزامتازون (Dex) بر MCS مشابه اثرات کاهش دهنده MCSE در دزهای ۱۰۰-۱۰۰۰mg/kg است.

همچنان که درنمودارهای ۵و ٦ و ۷ نشان داده شده است تجویز عصاره آبی زعفران (ACSE) در موش‌های مبتلا به EAE در دزهای غیر کشنده (۰/۰۵ - ۰/۸g/kg body weight) هیچ اثر سرکوبگری بر علایم بالینی ندارد.

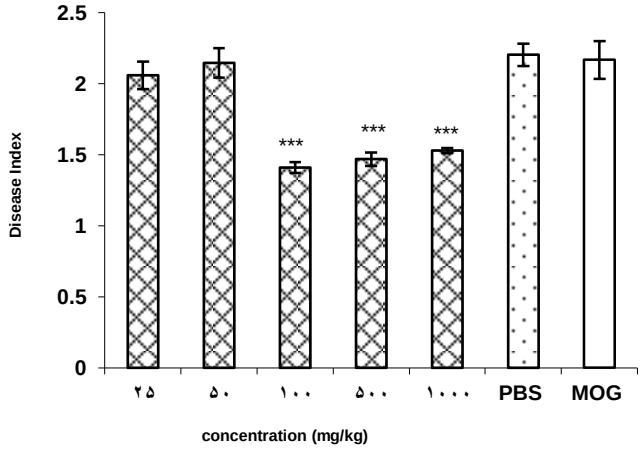
معنی‌داری تفاوت‌ها در روز شروع بیماری میان گروه‌ها ارزیابی نشد زیرا بررسی این موضوع در دستور کار این پژوهش نبود. همچنان که نمودار ۸ نشان می‌دهد شروع و پیشرفت EAE در همه نمونه‌ها مشابه بود. بعد از شروع تیمار، کاهشی تدریجی اما معنی‌دار در میانگین نمره‌های بالینی در نمونه‌هایی که ۱۰۰mg/kg و ۵۰۰mg/kg از عصاره متانولی کلاله زعفران دریافت نموده بودند مشاهده شد. دز ۱۰۰۰mg/kg از MCSE اثر بخشی کمتری داشت و تغییرات روزانه در MCS در پاسخ به این دز تدریجی‌تر بود.

نمودار۹ نشان می‌دهد که ACSE نمی‌تواند در میانگین نمره‌ها بالینی در موش‌های مبتلا شده به EAE تغییری ایجاد کند. همچنان که به خوبی در این منحنی‌ها قابل تشخیص است از کمترین دز تا بیشترین دز عصاره‌های آبی هیچ تغییری در پیشرفت و شدت بیماری EAE ایجاد نمی‌کنند.

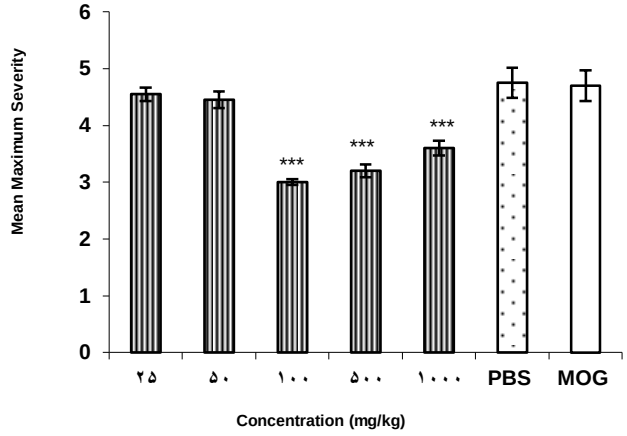
نتایج بالینی گروه‌های مختلف تیمار شده با عصاره‌های متانولی و آبی زعفران، دگزامتازون، PBS و MOG به همراه ادجاونت (گروه sham) در جدول ۱ ارائه شده است. برای اختلاف‌های معنی‌دار با $p \leq 0.001$ از علامت سه ستاره استفاده شده است.اشکال ۱و ۲ منحنی‌های مربوط به طیف‌سنجی UV/Visible عصاره‌های متانولی و آبی زعفران را در گستره نور مرئی/ فرابنفش ۲۰۰ -۷۰۰nmنمایش می‌دهند.



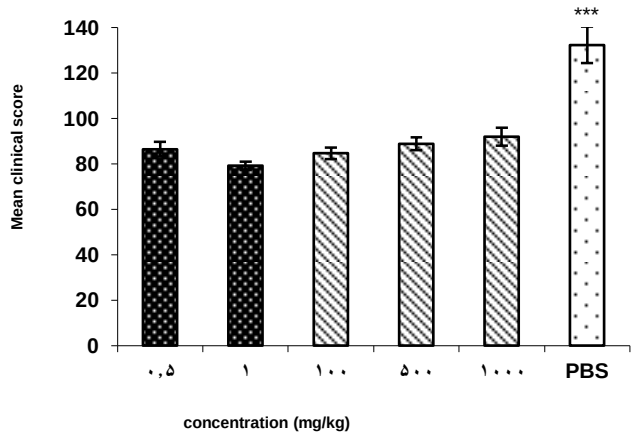
نمودار ۱: اثر MCSE بر میانگین نمره‌های بالینی در موش ماده C57BL/6 مبتلا به EAE القا شده با pMOG در مقایسه با گروه کنترل منفی (PBS) و گروه sham(MOG). آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی شفه بین میانگین‌ها ±SEM نشان دهنده اختلاف معنی دار با $p \leq 0.001$ است.



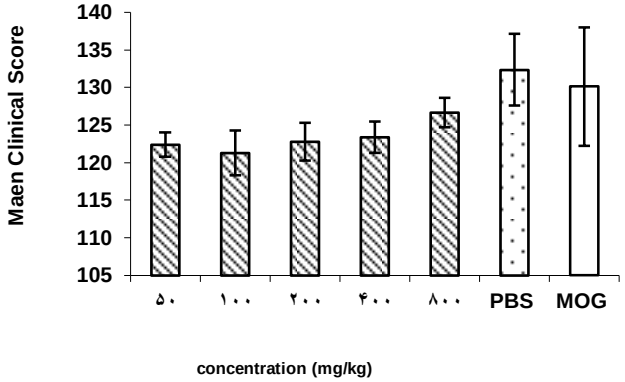
نمودار ۲: اثر MCSE بر اندکس بیماری ±SEM نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان دزهای ۱۰۰mg/kg،۵۰۰mg/kg و ۱۰۰۰mg/kgبا دیگر گروه‌ها است ($p \leq 0.001$).



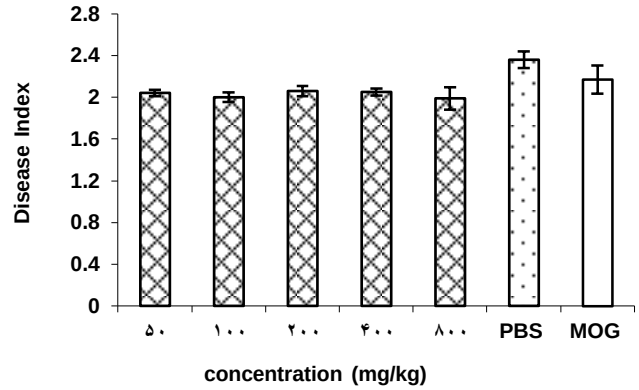
نمودار ۳: اثر MCSE بر MMS در موش‌های ماده مبتلا به EAE حاصل از ایمونیزاسیون با pMOG نشان دهنده اختلاف‌های معنی‌داری بین گروه‌ها است ($MMS \pm SEM, P \leq 0.001$).



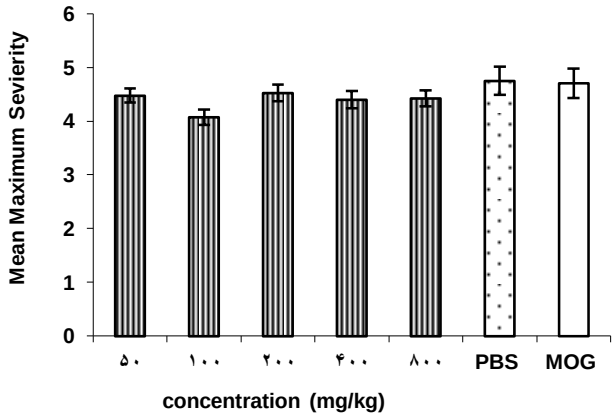
نمودار ۴: دگزامتازون در دزهای ۰/۵mg/kg و ۱mg/kg به موش‌های C57BL مبتلا به EAE تزریق شد. اثرات آن با اثر دزهای سرکوبگر التهاب عصاره متانولی زعفران و با PBS مقایسه شد. نتایج نشان دهنده اختلاف معنی داری میان موش‌های تیمار شده با PBSبا سایر گروه‌های تجربی است ($MCS \pm SEM, P \leq 0.001$).



نمودار ۵: میانگین نمره‌های بالینی در موش‌های ماده C57BL/6 مبتلا شده به EAE در پی دریافت pMOG تحت تاثیر تیمار با دزهای مختلف عصاره آبی زعفران در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی (PBS) و گروه sham(MOG) . عصاره‌های آبی زعفران هیچ اثر سرکوبگر یا تخفیف دهنده‌ی معنی‌داری بر MCS نشان نمی‌دهند ($MCS \pm SEM, P \leq 0.001$).

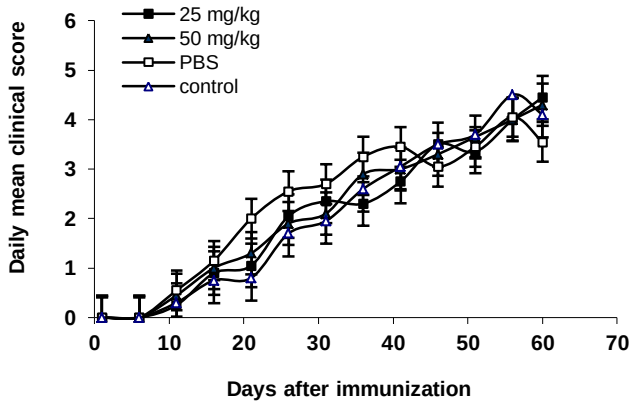


نمودار ٦: تجویز ASCE در غلظت‌های مختلف هیچ اختلاف معنی داری بر اندکس بیماری در موش‌های ماده C57BL/6 مبتلا به EAE القا شده با pMOG در مقایسه با گروههای کنترل منفی (PBS) و sham (MOG) نشان نمی‌دهد ($DI \pm SEM, P \leq 0.001$).

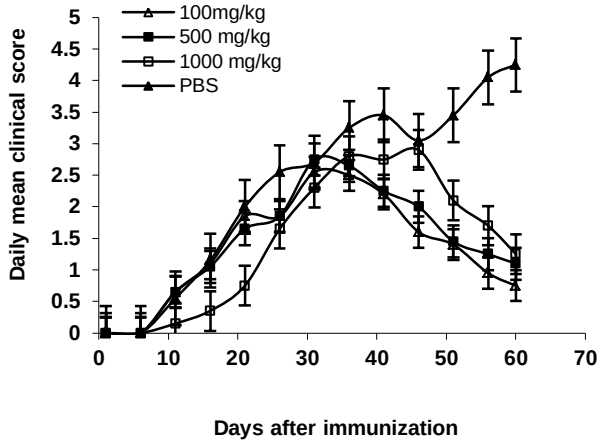


نمودار ۷:مقایسه میانگین بیشینه شدت در موش‌های ماده C57BL/6 تیمار شده با ۵ غلظت مختلف از ACSE با گروه کنترل منفی (PBS) و گروه sham (MOG). هیچیک اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند ($MMS \pm SEM, P \leq 0.001$) .

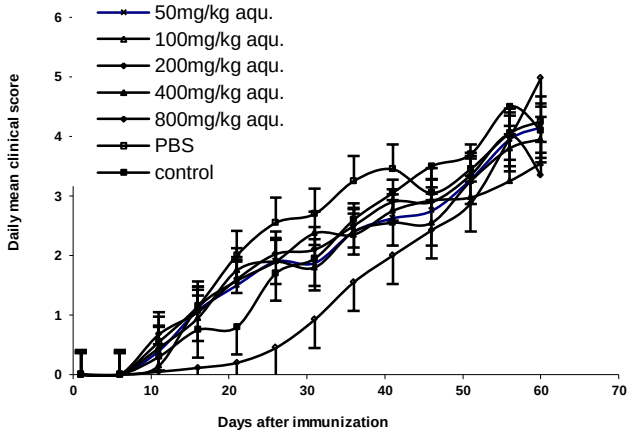
الف



ب



نمودار ۸: منحنی های الف و ب نمایانگر اثرات سرکوبگر سه دز ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم ازعصاره متانولی زعفران بر MCSروزانه در مقایسه با سایر گروه‌ها هستند.

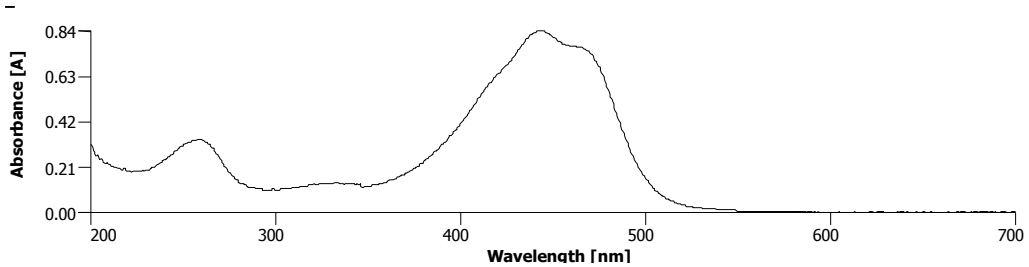


نمودار ۹: منحنی مربوط به رابطه میان اثر دزهای مختلف عصاره آبی زعفران با MSC روزانه در موش‌های ماده C57BL/6 مبتلا شده به EAE و مقایسه آنها با اثرات تزریق PBSو MOG (گروه کنترل یا همان sham). منحنی‌ها هیچ اختلاف معنی‌داری را با هم نشان نمی‌دهند.

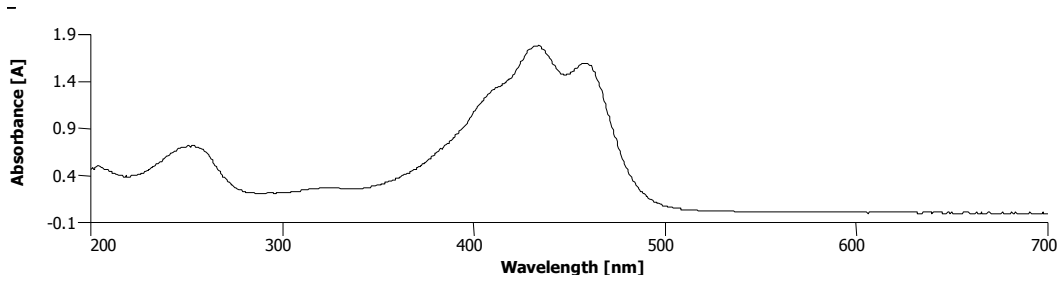
جدول ۱- نشان دهنده تغییرات علایم نورولوژیک در موش‌های ماده C57BL/6 مبتلا به EAE متعاقب تجویز عصاره‌های متانولی و آبی کلاله‌های زعفران در مقایسه با گروه‌های شاهد مثبت (دگزامتازون)، کنترل منفی (PBS) و sham (MOG + adjuvant)

Treatment (mg/kg body weight)	N	Disease index± SEM	Mean maximum severity ± SEM	Mean clinical score ± SEM
Methanol extract				
25	10	2.06± 0.098	4.55± 0.122	121.75± 5.59
50	10	2.147± 0.103	4.45± 0.145	129.05± 6.22
100	10	1.41± 0.042***	3± 0.052***	84.75± 2.53***
500	10	1.47± 0.046***	3.2± 0.116***	88.85± 2.73***
1000	10	1.53± 0.02***	3± 0.131***	92± 4.08***
Aqueous extract				
50	20	2.04± 0.03	4.475± 0.19	122.4± 1.6
100	20	2± 0.046	4.075± 0.21	121.3± 2.97
200	20	2.06± 0.056	4.525± 0.236	122.8± 2.5
400	20	2.051± 0.033	4.4± 0.226	123.4± 2.07
800	20	1.99± 0.11	4.425± 0.223	
Dexamethasone				
0.5	10	1.44± .052 ***	3.3± 0.052***	86.45± 3.171 ***
1	10	1.318± .03 ***	3.25± 0.14 ***	79.25± 1.85 ***
PBS	10	2.36 ± 0.08	4.75± 0.263	132.35± 4.77
MOG+ adjuvant	10	2.17± 0.133	4.7± 0.274	130.15± 7.89

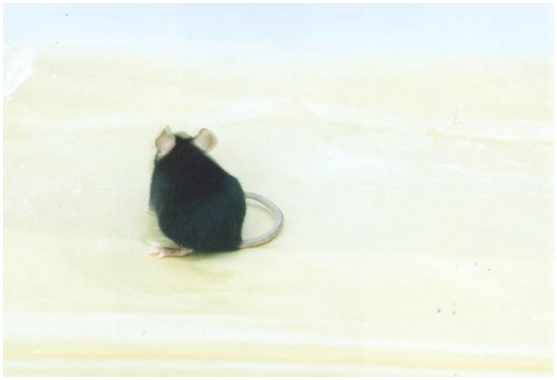
معنی داری اختلاف‌ها از گروهتیمار شده با PBSو از گروه تیمار شده با MOG + adjuvant : *** ($P \leq 0.001$)



شکل ۱- طیف عصاره آبی کلالاله زعفران در بازه ۷۰۰- ۲۰۰ نانومتر



شکل ۲- طیف عصاره متانولی زعفران در بازه ۷۰۰- ۲۰۰ نانومتر: در فاصله بحرانی مخصوص مواد موثره زعفران تفکیک بیشتری را نسبت به عصاره آبی نشان می‌دهد.



شکل ۳- موش C57lBL6 مبتلا شده به سطح ۱ از مدل تجربی انسفالومیلیت خود ایمن تجربی. به شکل حلقه‌ای دم توجه کنید.

بحث

کوشش‌های بسیاری به کار گرفته شده است تا مواد جدیدی برای مهار یا سرکوب پیشرفت بیماری مالتیپل اسکلروزیس یافت شوند. در دهه اخیر، توجه زیادی به سوی محصولات گیاهی و مواد طبیعی که بتوانند نشانه‌های بالینی MS را محدود کنند از جمله زعفران، معطوف شده است.

قزوی و همکاران در ۲۰۰۹ نشان دادند که استفاده از عصاره اتانولی زعفران در موش‌های C57BL/6 مبتلا شده به مدل تجربی EAE با استفاده از پپتید MOG_{35-55}، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را افزایش و ارتشاح (انفیلتراسیون) گلبوب‌های سفید را به داخل CNS کاهش می‌دهد. همچنین موش‌هایی که به شیوه چیش تیمار عصاره الکلی زعفران را دریافت کرده بودندنسبت به موش‌های کنترل دیرتر و خفیف‌تر به EAE مبتلا شدند [۲۸].

در پژوهش حاضر به منظور حرکت در مسیر دستیابی هر چه سریعتر به امکان مهار علایم و یا شاید درمان این بیماری بسیار ناتوان کننده با استفاده از ایجاد مدل تجربی انسفالومیلیت خود ایمن تجربی به عنوان مدلی جانوری برای مالتیپل اسکلروزیس از روش عصاره گیری زعفران به دو شیوه الکلی (متانولی) و آبی بهره گرفتیم. همچنان که در بخش نتایج عنوان شد عصاره متانولی کلاله زعفران نشانه‌های EAE را در موش‌ها سرکوب کرد اما عصاره آبی زعفران تاثیری نداشت. این در حالی است که یافته‌های حاصل از پژوهش آذری و همکاران در ۲۰۱۸ حاکی از آن است که عصاره آبی زعفران و کروسین سطح مولکول Olig2 را در موش‌های مبتلا به EAE به عنوان شاخص تمایز اولیگودندروسیتی افزایش می‌دهد [۳۰]. بیشینه دُز غیر کشنده عصاره متانولی زعفران ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن رت و موش است ولی با مصرف دزهای بیش ۱g/kg خطر بروز مسمومیت و حتی مرگ به طور فزاینده‌ای افزایش می‌یابد [۱۶، ۱۴]. ما در این آزمایش از دزهای ۱g/kg و کمتر عصاره متانولی زعفراناستفاده کردیم تااز بروز مسمومیت و دیگر عوارض جانبی در موش‌ها پیشگری شود. فعالیت سرکوبگر MCSE شباهت بسیار زیادی به اثرات حاصل از دگزامتازون دارد. دگزامتازون یک داروی ضد التهاب است که در روند درمان حاد اسکلروز چند گانه در انسان‌های مبتلا مورد استفاده قرار می‌گیرد. شواهدی وجود دارد مبنی بر این که دگزامتازون می‌تواند جلوی تخریب سد خونی مغزی را بگیرد. این دارو EAE را در رت‌ها سرکوب می‌کند. شباهت اثرات سرکوبگر دگزامتازون و عصاره متانولی زعفران بر علایم EAE حاکی از آن است که شاید عصاره متانولی هم از تخریب سد خونی مغزی جلوگیری، و به عنوان یک ترکیب سرکوب کننده ایمنی عمل می‌کند اما، این موضوع نیازمند بررسی و تحقیق است.

پژوهشگران همچنین برای عصاره‌های آبی و اتانولی اجزای کلاله، گلبرگ و پیاز .*Crocus sativus L*اثر ضد التهابی گزارش نموده‌اند [۱۳،۲۹]. انجام مطالعات شیمیایی بر روی کلاله *Crocus sativus* نشان دهنده وجود ترکیباتی همچون کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها و ساپونین‌ها در آن است. اثرات سرکوبگر علایم انسفلومیلیت حاصل از MCSE می‌تواند مربوط به عملکرد یکی از اجزاء آن باشد. به ویژه در پژوهش منتشر نشده‌ای که توسط همین گروه پژوهشی انجام شده است نشان داده شده است که کروسین (کاروتنوئید مسئول رنگ قرمز زعفران) استخراج شده از کلاله زعفران، اثر ضد التهابی دارد و اثر

مهار کننده علایم بالینی EAE آن مشابه اثرات سرکوبگر MCSE است.

آذری و همکاران در پژوهش خود نشان داده‌اند که کروسین در مدل EAE در موش‌های C57BL/6 مانع میلین‌زدایی و فعالیت‌های تخریب گر عصبی می‌شود. به علاوه این ماده اثرات ضد التهابی بر روی سلول‌های میکروگلی مغزی دارد [۳۰].

پورصمیمی و همکاران در سال ۲۰۲۰ اعلام نموده‌اند که زعفران درمانی در موش‌های مبتلا به آسیب مغزی القا شده با ایسکمی هیپوکسیک، التهاب را کاهش و اثر درمان هیپوترمی را افزایش می‌دهد [۱۴].

معلوم نیست که چرا عصاره آبی زعفران در این پژوهش نشانه‌های نورولوژیک متداول EAE را سرکوب نکرد ولی عصاره متانولیاین اثر را نشان داد. البته چنین حدس زده می‌شود که متانول بهتر و سریع‌تر می‌تواند مواد موثر در زعفران (از جمله کاروتنوئیدها) را بیرون بکشد. به ویژه که بسیاری از ترکیبات موجود در زعران نسبت به نور حساس هستند و با گذشت زمان تخریب می‌شوند. با این حالنقش اصلی اجزای موثر زعفران و سازوکار(های) مسئول فعالیت فارماکولوژیک MCSE نیازمند پژوهش‌های بیشتر است با این حال مطالعات متعدد بر روی سلول‌های جانوری نشان داده اند که زعفران و اجزای آن با مهار تولید رادیکال‌های آزاد و تقویت فعالیت آنتی‌اکسیدانی به شیوه‌ای وابسته به مسیر ERK1/2 نقش‌های محافظت کننده‌ای در دستگاه عصبی ایفا می‌کنند (۱۴). از طرفی کروسین استخراج شده از زعفران به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی شناخته شده خود با افزایش سطح گلوتاتیون و مهار JNK مرگ سلول‌های عصبی ناشی از استرس ایسکمیک را کاهش می‌دهد. به علاوه سافرانال، کروسین و کروستین با کاهش سطح مولکول‌های نوروتوکسیک در میکروگلی‌های فعال شده اثرات محافظت کنندگی عصبی خوبی به ویژه در هیپوکامپ نشان می‌دهند [۳۰].

بررسی بالینی منتشر شده توسط مشیری و همکاران در سال ۲۰۱۵ درباره اثرات ضد آلزایمر زعفران حاکی از آن است که استفاده از زعفران در افراد مبتلا به آلزایمر در مقایسه با دارونما اثرات ضد آلزایمری و ضد افسردگی معنی‌داری داشته است [۳۱]. نمود نقش‌های محافظت کننده عصبی زعفران به صورت ممانعت از بروز تغییرات نوروپاتولوژیک در ناحیه هیپوکامپ و بهبودی متعاقب حافظه و یادگیری فضایی در موش از راه تنظیم کاهشی عوامل اکسید کننده هم در بعضی از پژوهش‌ها نشان داده شده است. مشابه همین نتایج در زمینه نقش محافظت کننده عصبی زعفران د رانسان هم نشان داد شده است. بر همین اساس یک مطالعه بالینی آشکار کرده است که درمان با زعفران اثرات محافظت کننده عصبی کوتاه مدت و بلند مدت در بیماران مبتلا به سکته مغزی ایسکمیک دارد [۱۴].

در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش پیشنهاد کننده آن است که عصاره متانولی زعفران دارای نقش محافظت کننده‌ای از دستگاه عصبی در برابر عودهای EAE و حملات آسیب رسان سامانه ایمنی به این دستگاه در موش‌ها است که با توجه به شباهت این اثرات به اثر دگزامتازون پیشنهاد می‌شود که عصاره متانولی زعفران اثرات ضد التهابی مشخص دارد و با مهار روند التهاب که از ارکان اصلی اختلالات خود ایمنی از جمله EAE تجربی است سبب بهبود علائم این بیماری در موش‌های مبتلا می‌گردد. مطالعات بیشتری در این راستا توسط این گروه پژوهشی انجام شده است که نتایج آن در آینده منشر خواهد شد.

تقدیر و تشکر

هزینه‌ها و امکانات آزمایشگاهی انجام این پژوهش توسط جناب آقای دکتر محمد حسین صنعتی و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری فراهم گردید که بدین‌وسیله مراتب قدرانی خود را از ایشان اعلام می‌کنیم. همچنین لازم می‌دانیم تا به واسطه حمایت‌های معنوی و در یک مورد حمایت مالی جهت خرید سم سیاه سرفه از سرکار خانم دکتر پروین رستمی سپاسگزاری نماییم.

References

[1] Soeda S., Ochiai T., Paopong L., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H., Crocin suppresses tumour necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. Life Sci. 2001 (69):2887-298

[2] Deuvaux B., Enderlin F., Wallner B., Smilek DE., Induction of EAE with recombinent human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide. J Neuroimmunology 1997; (75):169-175

[3] Ghazavi A., Mosayebi G., Salehi H., Abtahi H., Effects of ethanol extract of saffron (Crocus sativus L.) on inhibition of

experimental autoimmune encephalomyelitis in C57Bl/6 mice. Pak J Biol. Sci. 2009 May; 12(9):690-695 doi:10.3023/pjbs.2009.690.695

[4] Gommerman J.L., Giza K., Perper S., Sizing I., Ngam-ek A., Nickerson-Nutter C., Browning J.L., A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT. J clin Invest. 2003; (112):755-767

[5] Probert L., Eugster H.P., Akassoglou K., Bauer J., Frei K., Lassmann H., Fontana A., TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease. Brain 2000 (123):2005-2019

[6] Linares D, Mana P, Goodyear M, Chow AM, Clavarino C, Huntington ND, Barnett L, Koentgen F., Tomioka R., Bernard C.C.A., Freier-Garabal M., Reid H.H., The magnitude and encephalitogenic potential of autoimmune response to MOG is enhanced in MOG deficient mice. J Outoimmun. 2003; (21):339-351

[7] Voskuhl R.R., Mackenzie-Graham A., Chronic Experimental autoimmune encephalomyelitis is an excellent model to study neuroaxonal degeneration in multiple sclerosis. Frontiers in Molecular Neuroscience 2022 October; 01-12 doi; 103389/fnmol.2022.1024058

[8] Faridi S., Delirezh N., AbtahiFroushani SM., beneficial effects of hydroalcoholic extract of saffron in alleviating experimental autoimmune diabetes in C57BL/6 mice. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2019 February; 18(1):38-47

[9] leadbetter E.A., Bourque C.R., Devaux B., Olson C.D., Sunshine G.H., Hirani S., Wallner B.P., Smilek D.E., Happ M.P., Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. J immunol. 1998; (161):405-512

[10] Part E., Martin R., The immunopathogenesis of multiple sclerosis. J Rehablit Res Devl 2002; (39):187-199

[11] Paul C., Bolton C., Inhibition of blood brain barrier disruption in experimental allergic encephalomyelitis by short-term therapy with dexamethasone or cyclosporin A. Int J Immunopharmac 1995; (17):497-503

[12] Gilgun-Sherki Y., Panet H., Holdengerber V., Mosberg-Galili R., Offen D., Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic–induced experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroscience research 2003; (47) 201-207

[13] Hosseinzadeh H., Younesi H.M., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of crocus sativus L. Stigma and petal extracts in mice. BMC Pharmacol. 2002; (2):1-8

[14] Poursamimi J., Shariati-Sarabi Z., Tavakkol-Afshari J., Mohajeri SA., Mohamadi M., Crocus sativus (saffron): An immunoregulatory factor in the autoimmune and non-autoimmune diseases. Iran J Allergy Asthma Immunol 2020 May; 19(supple-1):28-42

[15] Rois J.L., Rico M.C., Ginger R.M., Manz S., An update review of saffron and its active constituents. Pytother Res. 1996 (10):189-193

[16] Hosseinzadeh H., Khosravan V., Anticovulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of Crocus sativus L. stigmas in mice. Arch Irn Med. 2002; (5):44-47

[17] Hosseinzadeh H., Karimi G.H., Niapoor M., Antidepressant effects of crocus sativus stigma extracts and its constituents, crocin and safranal in mice. ActaHort (ISHS) 2004; (650) 435-45

[18] Abdullaev F.I., Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (crocus sativus L.). ExptlBiol Med. 2002b; (227):20-25

[19] Abe K, Sugiura M., Shoyama Y., Saito H., Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. Brain Research 1998; (787):132-138

[20] Abe K, Sugiura M., Yamaguchi S., Shoyama Y., Saito H., Saffron extract prevents acetaldehyde-induced inhibition of long-term potentiation in rat dendate gyrus in vivo. Brain Research 1999; (581):287-289

[21] Soeda S., Ochiai T., Paopong L., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H., Crocin suppresses tumour necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. Life Sci. 2001 (69):2887-298

[22] Zhang Y.X., Sugiura M., Saito H., Shoyama, Y., Acute effects of Crocus SativusL.on passive avoidance performance in mice. BiolPharmachol Bull. 1994 (17):217-221

[23] Soeda S., Ochiai T., Paopong L., Tanaka H., Shoyama Y., Shimeno H., Crocin suppresses tumour necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. Life Sci. 2001 (69):2887-298

[24] Nair S.C., Kurumboor S.K., Hasegawa J.H., Saffron chemopeventive in biology and medicine: a review. Cancer Biother. 1995; (10):257-264

[25] Premkumar K., Abraham S.K., Santhiya S.T., Gopinath P.M., Ramesh A., Inhibition of genotixicity by saffron (Crocus sativus L.) in mice. Drug ChemToxicol. 2001; (24):421-428

[26] Premkumar K., Abraham S.K., Santhiya S.T., Ramesh A., protective effects of saffron (crocus sativus L.) on genotoxins-induced oxidative stress in swiss albino mice. Phytother Res. 2003; (17):614 –17

[27] Hosseinzadeh H., Sadeghnia H.R., Safranal, a constituent of Crocus sativus (saffron) attenuated cerebral ischemia induced oxidative damege in rat hippocampus. J Pharm Pharmaceut Sci. 2005; (8):394-399

[28] Gharagozloo M., Mace J.W., Calobresi P. A., Animal models to investigate the effects of inflammation on remyelination in multiple sclerosis. Frontiers in Molecular Neuroscience 2022 November; 01-10 doi:10.3389/fnmol.2022.995477

[29] Ghazavi A., Mosayebi G., Salehi H., Abtahi H., Effects of ethanol extract of saffron (Crocus sativus L.) on inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57Bl/6 mice. Pak J Biol. Sci. 2009 May; 12(9):690-695 doi:10.3023/pjbs.2009.690.695

[30] Escribano J., Diaz-Guerra M.J.M., Reise H.H., Ontanon J., Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Robio A., Fernandez J.A., IN vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of crocus sativus L. Cancer Letters 1999; (144):107-114

[31] Azari H., Ebrahimi S., Saeb s., Ghanbari A., et al., The effect of saffron aquatic extract and crocin on the differentiation of Neuralstem cells into oligodendrocyte precursor cells. Shiraz E-Medical Journal 2018 March;19(3): e60190

[32] Moshiri M., Vahabzadeh M., Hosseinzadeh H., Clinical application of saffron (Crocus sativus) and its constituents: A Review. Drug Res. (stuttg) 2015 Jun; 65(6):287-295

An Investigation on the Effects of Methanol Extract of saffron on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 mice

Eslambolchi Sh. [1*], Sanati M. H.[2], Haghbin K.[3]

[1] Biology Department, Faculty of Biology, Islamic Azad university- North Tehran Branch, Tehran.Iran
[2] Medical Genetic Laboratory, Medical Genetic Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran. Iran
[3] Biochemistry Laboratory, Plant bioproductsDepartment, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran. Iran

* (Corresponding author): seslambolchy@yahoo.com

Received: December 2023 Accepted: January 2023

Abstract

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an inflammatory demyelinating disease of central nervous system and commonly used as an animal model for multiple sclerosis (MS).Multiple sclerosis is a disabling neurodegenerative disease in human being. Inflammation is a key event in both EAE and MS, which leads to demyelination and subsequent disability. It is shown that crocus sativus L. stigma (saffron) extracts have anti-inflammatory activity in rats and mice. There are modern pharmacological evidences for anti-tumour, chemopreventive and genoprotective effects as well as radical scavenger properties of saffron extracts or its constituents. We observed that both therapeutic doses of dexamethasone and methanol extracts of saffron stigma at 100mg/kg and more prevented EAE from progression significantly in pMOG-immunized female C57BL/6 mice. Aqueous maceration extract of Crocus sativus L. did not prevent EAE progression. These results suggest that saffron may attenuate symptoms of EAE by its anti-inflammatory activity.Experimental data analyzed by one-way ANOVA.

Keywords: EAE, MS, SaffronMOG, C57BL/6 mice.